

University of Groningen

Regulation and expression of the metal citrate transporter CitM of *Bacillus subtilis*

de Jonge - Warner, Jessica

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2002

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

de Jonge - Warner, J. (2002). *Regulation and expression of the metal citrate transporter CitM of Bacillus subtilis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

VIII

Samenvatting voor alle anderen

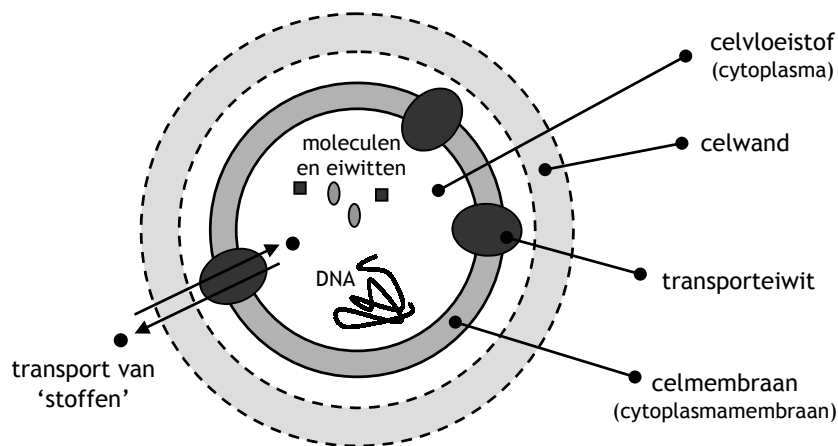
Voor het bestuderen van biologische processen, zoals die plaatsvinden in alle levende cellen van zowel flora als fauna, wordt vaak gebruik gemaakt van bacteriën. Bacteriën beschikken namelijk over dezelfde of vergelijkbare biologische processen, maar zijn veel makkelijker te hanteren. Ze vermenigvuldigen zich snel (soms zelfs een verdubbeling elke 20 minuten onder ideale groeiomstandigheden) en zijn in staat zich constant aan te passen aan veranderingen in de leefomgeving. Daarnaast kan het DNA van bacteriën, dat alle genetische informatie bevat die nodig is om biologische processen te laten verlopen, relatief eenvoudig worden aangepast (genetische manipulatie). Aanpassingen van deze biochemische informatie resulteren in veranderingen in biologische processen. Hierdoor kan inzicht in de rol van specifieke biologische processen worden verkregen.

Naast het fungeren als modelorganisme voor het bestuderen van biologische processen, worden bacteriën ook ingezet om chemische reacties uit te voeren onder bijzondere omstandigheden (kleine fabriekjes). Melkzuurbacteriën zijn bijvoorbeeld bestand tegen een zuurdere omgeving en zijn betrokken bij de bereiding van o.a. yoghurt. De melksuiker lactose zetten ze om in het zure melkzuur, zodat van melk yoghurt kan worden gemaakt. Onderzoek naar de werking van bacteriën in dergelijke processen kan leiden tot productverbetering en nieuwe toepassingen.

De veelbestudeerde bacterie *Bacillus subtilis* is onderwerp van dit proefschrift. De bacterie komt van nature voor in de grond en is geheel aangepast om in deze omgeving te overleven. Daarom is *Bacillus subtilis* in staat onder uiteenlopende omstandigheden te groeien (kouder of warmer, licht zuur of licht basisch, meer of minder zuurstofrijk) en verschillende voedingsstoffen te gebruiken als bron van energie. Natuurlijk moeten deze voedingsstoffen, die buiten de bacteriecel aanwezig zijn, op een of andere wijze de cel in worden gebracht (opname) en moeten afvalproducten, die ontstaan na het verbruik van die voedingsstoffen, vervolgens weer worden uitgescheiden (excretie). Deze twee processen worden uitgevoerd door zogeheten transporteiwitten. In dit proefschrift is beschreven hoe een transporteiwit uit *Bacillus subtilis*, speciaal bedoeld voor de opname van complexen van citraat met metaal, zijn 'werk' doet en onder welke omstandigheden. Om de uitvoering en de resultaten van dit promotieonderzoek duidelijk te kunnen omschrijven, wordt in de volgende paragrafen kort ingegaan op wat transporteiwitten zijn, wanneer ze aan het 'werk' worden gezet en hoe dat wordt geregeld.

Bacteriecel en transporteiwitten

Een bacterie is een micro-organisme, dat bestaat uit een cel die grofweg is opgebouwd uit een celwand, een celmembraan en celvloeistof (zie Fig. 1). De celvloeistof, cytoplasma genaamd, vormt de vloeibare inhoud van de cel met vele moleculen en eiwitten en bevat de drager van alle biochemische informatie, het DNA. De celwand is de buitenste schil van een bacteriecel en zorgt voor de stevigheid van de cel. Allerlei moleculen en stoffen van verschillende grootte en met verschillende lading (positief, negatief of ongeladen) kunnen de celwand passeren. Echter zij komen niet allemaal voorbij de tweede schil, die wordt gevormd door de celmembraan, alias cytoplasmamembraan. Alleen water en kleine ongeladen moleculen zien kans de celmembraan te passeren. Zo beschermt de celmembraan de inhoud van de cel tegen stoffen die schadelijk zijn voor de biologische processen, die binnen in de cel plaatsvinden. Daarentegen moeten stoffen en moleculen die nodig zijn voor groei en energie wel worden 'binnengelaten' en dienen afvalstoffen te worden afgevoerd.



Figuur 1. Schematische weergave van de opbouw van een bacteriecel.

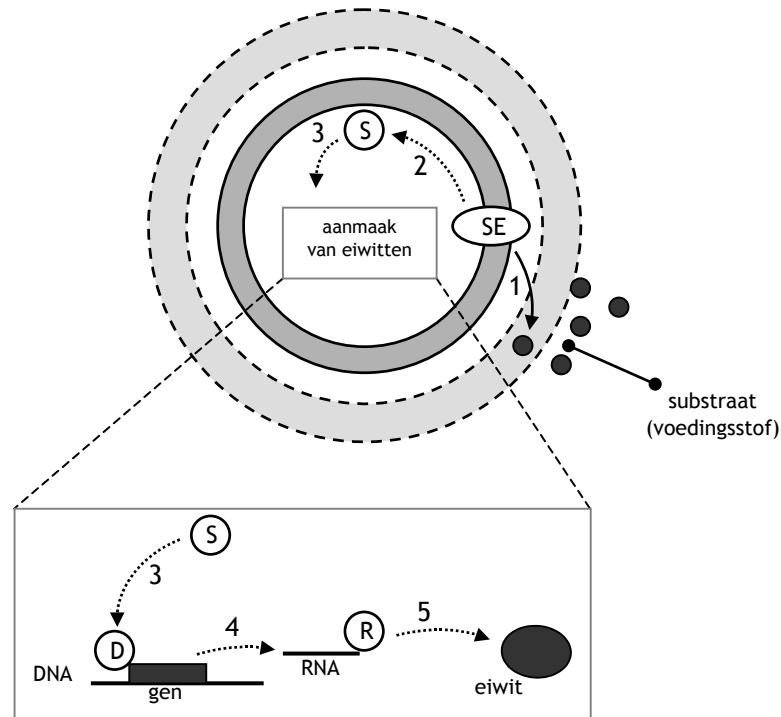
Om dit te bewerkstelligen, zitten in de celmembraan transporteiwitten die selectief stoffen van buiten naar binnen of van binnen naar buiten kunnen brengen. Ze zijn te vergelijken met een automatische draaideur: zodra een stof buiten de cel 'instapt', gaat de deur draaien en brengt het de stof naar binnen. Dit gebeurt vice versa wanneer een stof de cel moet verlaten. De stoffen die getransporteerd worden, worden substraten genoemd. Elk transporteiwit is geschikt om een of enkele typen substraten te 'vervoeren'. Dit betekent dat er veel

transporteiwitten beschikbaar moeten zijn om allerlei verschillende substraten in of uit de cel te krijgen. Hoe dat in een cel is geregeld, wordt hieronder uitgelegd. Om het verhaal eenvoudig te houden, is uiteengezet welke gebeurtenissen plaatsvinden wanneer een substraat van binnen naar buiten wordt getransporteerd. Dezelfde principes gelden ook voor excretieprocessen.

Wanneer en hoe worden transporteiwitten aan het werk gezet

Het aanbod van voedingsstoffen (substraten) wisselt vaak. Een bacterie moet zich dan ook continu aanpassen om voldoende ‘voeding’ en dus energie ‘binnen te krijgen’. Als een bepaald substraat aanwezig is, zal de bacterie een specifiek transporteiwit nodig hebben om dat substraat op te nemen. Soms is er al zo’n specifiek transporteiwit aanwezig in de celmembraan. Echter, vaak is dit niet het geval of zijn er niet voldoende van deze transporteiwitten aanwezig en moeten er transporteiwitten worden bijgemaakt. Maar hoe ‘weet’ een bacterie of substraten beschikbaar zijn en hoe worden dan de juiste transporteiwitten aangemaakt?

Het substraat wordt allereerst opgemerkt door specifieke ‘sensor’ eiwitten, die de aanwezigheid van een of enkele substraten binnen of buiten de cel aanvoelen (Fig. 2, stap 1). Sommige ‘sensor’ eiwitten zitten in de celmembraan om de leefomgeving van de cel te scannen, andere zijn in de cel aanwezig. Wanneer de aanwezigheid van een substraat is opgemerkt, wordt er in de cel een signaal afgegeven (stap 2) om (extra) transporteiwitten aan te maken (eiwitsynthese). Dit signaal komt of via de ‘sensor’ eiwitten zelf of via specifieke ‘signaal’ eiwitten terecht bij het DNA van de bacterie (stap 3). Het DNA is opgebouwd uit functionele eenheden, die genen worden genoemd. Elk gen bevat de instructies en informatie (genetische informatie) om een bepaald soort (transport)eiwit aan te maken. De genetische informatie wordt gelezen door een ‘decoder’ eiwit (de RNA polymerase) en omgezet (transcriptie) in een opdracht voor de aanmaak van een eiwit (stap 4), het RNA (sterk verwant aan het DNA). Het RNA brengt de instructies van het gen (DNA) over naar het ribosoom, een soort eiwitfabriek, dat de opdracht vertaalt en het eiwit aanmaakt (stap 5). Deze hele cascade, waarbij de informatie van het gen leidt tot de aanmaak van een eiwit wordt ook wel ‘de expressie van een gen’ genoemd. Op deze manier resulteert de aanwezigheid van een substraat (binnen of buiten de cel) in de aanmaak van een specifiek transporteiwit dat dit betreffende substraat kan ‘vervoeren’. Oftewel, de aanwezigheid van het substraat (ook wel “inducer” genoemd) leidt tot de expressie van het gen (zie Fig. 2).



Figuur 2. Schematische weergave van de aanmaak van een (transport)eiwit (expressie van een gen). Aangegeven zijn: SE, ‘sensor’ eiwit; S, signaleiwit; D, ‘decoder’ eiwit (RNA polymerase); R, ribosoom.

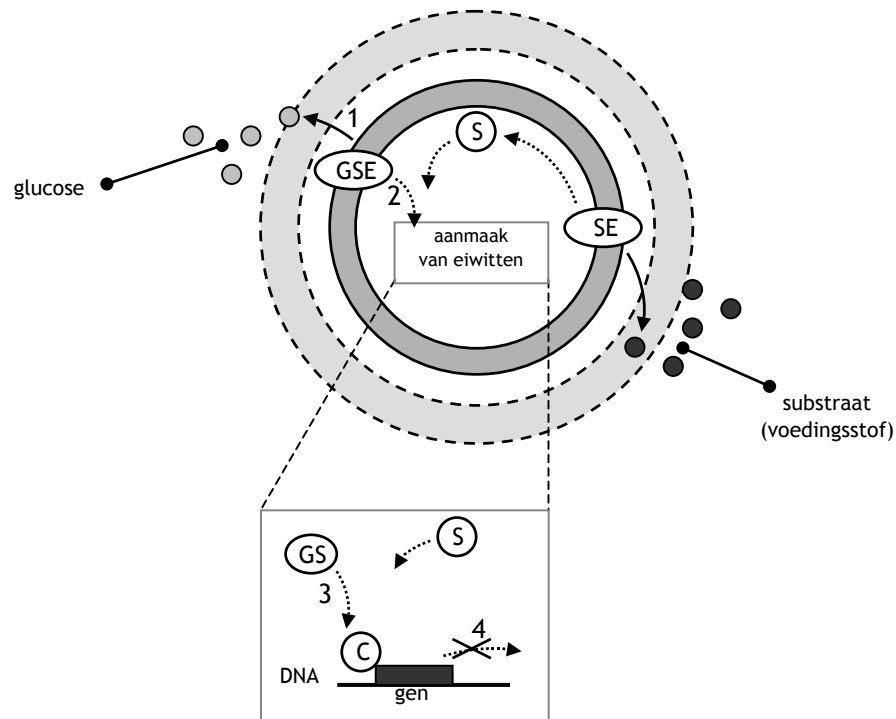
Concluderend, transporteiwitten worden alleen aangemaakt en aan het werk gezet als het te transporteren substraat aanwezig is. Is het substraat opgebraakt en/of lange tijd niet voor handen, dan is het desbetreffende transporteiwit niet nodig en wordt het afgebroken. De bouwstenen van het afgebroken eiwit kunnen dan weer worden gebruikt voor de aanmaak van een nieuw eiwit.

De aanmaak van transporteiwitten in de hand houden

Bacteriën houden de aanmaak van transporteiwitten wel in de hand. Wanneer bacteriën een mix van substraten wordt aangeboden, die ze kunnen gebruiken voor het verkrijgen van energie, maken ze niet voor elk substraat een transporteiwit aan. Het maken van al die transporteiwitten kost namelijk veel teveel energie. Daarentegen, om energieverbruik te beperken, kiezen bacteriën voor het ‘consumeren’ van één substraat dat gemakkelijk is om

te zetten en daarbij meestal de meeste energie oplevert. Voor veel bacteriën is dat favoriete substraat glucose (een suiker). Dat betekent dat de aanmaak van transporteiwitten nodig voor de opname van andere substraten uit de mix voorlopig overbodig is en dat de expressie van de bijbehorende genen moet worden tegengehouden. Bij het coördineren hiervan is een systeem betrokken, een regulatiesysteem.

In *Bacillus subtilis* bestaat dit systeem uit diverse eiwitten: eiwitten die de aanwezigheid van glucose opmerken (Fig. 3, GSE, stap 1) en dit laten weten aan andere eiwitten in de cel (stap 2), eiwitten die het afgegeven signaal doorgeven (GS, stap 3) en eiwitten die als reactie op het doorgegeven signaal de expressie van genen blokkeren (“repression”) (C, stap 4). De laatste categorie eiwitten, wordt ook wel regulatie-eiwitten genoemd, omdat zij daadwerkelijk de expressie van een gen regelen (reguleren). In *Bacillus subtilis* wordt de expressie van genen geblokkeerd door het regulatie-eiwit CcpA, dat reageert wanneer glucose in een mix van substraten aanwezig is (zie Fig. 3).



Figuur 3. Schematische weergave van het regelen van de aanmaak van een (transport)eiwit (regulatie van genexpressie). Aangegeven zijn: SE, ‘sensor’ eiwit substraat; S, signaleiwit substraat; GSE, ‘sensor’ eiwit glucose; GS, signaleiwit glucose; C, regulatie-eiwit CcpA.

Metaal-citraattransport in *Bacillus subtilis*

In het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, staat de regulatie en expressie van het transporteiwit CitM van *Bacillus subtilis* centraal. CitM is verantwoordelijk voor de opname van het substraat metaalcitraat, dat een complex is van citraat (citroenzuur) en metaalionen. Citraat is in overvloed aanwezig in de natuur en is bijvoorbeeld verantwoordelijk voor de zure smaak in sinaasappelen en andere citrusvruchten. Vanwege de negatieve lading in het citraat ion, is het in staat om positief geladen metaalionen te binden, zoals magnesium en calcium, maar ook meer giftige metalen, zoals nikkel en zink (ook wel zware metalen genoemd). Om milieubiotechnologische redenen is onderzocht of *Bacillus subtilis*, door gebruik te maken van dit metaalcitraat-transporteiwit, kan worden ingezet om (zware) metalen uit het milieu op te nemen. Een van de fundamentele vragen die daarvoor beantwoord moet worden, is onder welke groeiomstandigheden het metaalcitraat-transporteiwit wordt aangemaakt. Met andere woorden, welke substraten aan de buitenkant van de cel (in het groeimedium) hebben invloed op de aanmaak van dit transporteiwit.

Om deze vraag te kunnen beantwoorden moet de aanmaak van het transporteiwit kunnen worden aangetoond en gevolgd. Op twee manieren is dat gedaan: i) het transport van het substraat metaalcitraat over de celmembraan is gevolgd (immers metaalcitraat kan alleen worden getransporteerd als het transporteiwit ook is aangemaakt) en ii) het aflezen van het metaalcitraat-transporteiwit gen (*citM*) is gevolgd (want als het gen wordt afgelezen dan wordt het transporteiwit aangemaakt).

Bacillus subtilis kan citraat gebruiken als groeisubstraat en de aanwezigheid van metaalionen is essentieel hiervoor. Het metaalcitraat-transporteiwit is nodig om citraat in de cel te krijgen, waarna het citraat kan worden verbruikt. Dit is bevestigd in proeven die aantonen dat de opname van metaalcitraat alleen plaatsvindt als het CitM transporteiwit aanwezig is (Hoofdstuk 2). Bovendien kunnen *Bacillus subtilis* cellen, waarbij het CitM transporteiwit is weggehaald (genetisch gemanipuleerd), citraat niet meer gebruiken (Hoofdstuk 4). Zo is ook aangetoond dat CitM nog een tweede substraat kan transporteren: metaalisocitraat. Isocitraat is een tussenproduct in de afbraakroute van citraat en kan ook metaalionen binden. Citraat en isocitraat zijn beide “inducers” van het CitM gen, oftewel alleen in de aanwezigheid van een van deze substraten kan het CitM transporteiwit worden aangemaakt (Hoofdstukken 2 en 4). De aanwezigheid van metaalcitraat (of metaalisocitraat) wordt opgemerkt door een specifiek ‘sensor’ eiwit CitS, dat in de celmembraan van *Bacillus subtilis* is gelegen. Na detectie van metaalcitraat wordt de ‘boodschap’ doorgegeven aan het ‘signaal’ eiwit CitT, dat ervoor zorgt dat de ‘boodschap’ bij het CitM gen aankomt, zodat CitM transporteiwitten worden aangemaakt.

Zoals in vele andere bacteriën, is ook in *Bacillus subtilis* glucose het favoriete groeisubstraat en wordt verkozen boven andere substraten. Als naast metaalcitraat ook glucose beschikbaar is, dan 'kiest' *Bacillus subtilis* voor glucose. Het aflezen van het metaalcitraat-transporte eiwit gen (CitM gen) wordt stopgezet en metaalcitraat-transporteiwitten worden niet meer aangemaakt. Het regulatie-eiwit CcpA is betrokken bij het regelen van dit aflezen van het CitM gen (Hoofdstuk 2). Verder is gebleken dat niet alleen glucose, maar ook andere substraten de voorkeur krijgen boven metaalcitraat en het aflezen van het CitM gen beïnvloeden; metaalcitraat lijkt onder aan de hiërarchische ladder van substraten te staan. In al deze gevallen is het regulatie-eiwit CcpA betrokken bij het blokkeren van genexpressie. In hoofdstuk 5 wordt nog een nieuw regulatiesysteem beschreven, waarbij een ander regulatie-eiwit is betrokken bij het blokkeren van de expressie van het CitM gen.

Tot slot

Om gebruik te kunnen maken van *Bacillus subtilis* voor de verwijdering van (zware) metalen uit de leefomgeving moet er met een aantal zaken rekening worden gehouden. In de eerste plaats is het metaalcitraat-transporte eiwit CitM alleen functioneel aanwezig als de substraten metaalcitraat of metaalisocitraat beschikbaar zijn. Zij zijn de "inducers" van het CitM gen en zonder hen wordt het CitM transporteiwit niet aangemaakt. Daarnaast hebben diverse substraten een negatieve uitwerking op de aanmaak van het transporteiwit CitM en dienen deze substraten afwezig te zijn om blokkering van CitM genexpressie te voorkomen. Het is bovendien duidelijk geworden dat niet één, maar meerdere regulatiesystemen betrokken zijn bij het controleren van de aanmaak van het CitM transporteiwit. Dit laatste is overigens goed te begrijpen als men bedenkt dat een teveel aan CitM transporteiwitten zal leiden tot de opname van grote hoeveelheden metaalcitraat. Aangezien hoge concentraties metaalionen in de bacteriecel giftig zijn, zal de bacterie er alles aan doen om dit te voorkomen en zal het de aanmaak van CitM transporteiwitten dus strikt regelen. Om voor milieubiotechnologische toepassingen metalen toch in hoge concentraties in de bacteriecel te krijgen, zouden deze regulatiesystemen moeten worden uitgeschakeld. Het probleem van de giftigheid van de metalen is dan nog niet opgelost en zal verder onderzocht moeten worden.

